

PCT/CN03/00956

证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

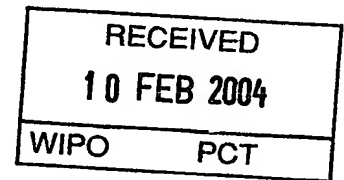
申 请 日： 2002 11 13

申 请 号： 02 1 45253.9

申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 利用人和鼠 R h o r 基因及其编码产物诊断和治疗秃发的方法

申 请 人： 中国科学院上海生物工程研究中心



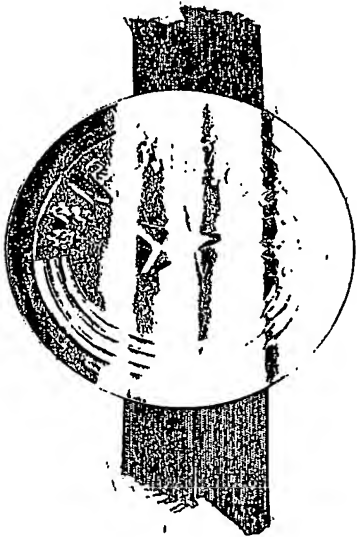
发明人或设计人：孔祥银；李善如；胡兰骢；史耀舟；滕晓坤

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

中华人民共和国
国家知识产权局局长

王景川

2004 年 1 月 17 日



权利要求书

1.一种分离的Rhor多肽，其特征在于，它包含：具有SEQ ID NO: 2氨基酸序列的多肽、或其保守性变异多肽、或其活性片段、或其活性衍生物。

2.如权利要求1所述的多肽，其特征在于，该多肽是具有SEQ ID NO: 2氨基酸序列的多肽。

3.一种分离的多核苷酸，其特征在于，它包含一核苷酸序列，该核苷酸序列与选自下组的一种核苷酸序列有至少70%相同性：

(a)编码如权利要求1和2所述多肽的多核苷酸；

(b)与多核苷酸(a)互补的多核苷酸。

4.如权利要求3所述的多核苷酸，其特征在于，该多核苷酸编码具有SEQ ID NO: 2所示氨基酸序列的多肽。

5.如权利要求3所述的多核苷酸，其特征在于，该多核苷酸具有SEQ ID NO: 1中1-2484位的序列。

6.一种载体，其特征在于，它含有权利要求3所述的多核苷酸。

7.一种遗传工程化的宿主细胞，其特征在于，它含有权利要求6所述的载体。

8.一种Rhor蛋白的制备方法，其特征在于，该方法包含：

(a)在表达Rhor蛋白的条件下，培养权利要求7所述的宿主细胞；

(b)从培养物中分离出Rhor蛋白。

9.一种检测秃发易感性的试剂盒，其特征在于，它包括特异性扩增Rhor基因或转录本的引物。

10.一种组合物，其特征在于，它含有安全有效量的权利要求1所述的多肽以及药学上可接受的载体。

说明书

利用人和鼠Rhor基因及其编码产物诊断和治疗秃发的方法

技术领域

本发明属于生物技术和医学领域，具体地说，本发明涉及新的编码秃发相关蛋白-Rhor的多核苷酸，以及此多核苷酸编码的多肽。本发明还涉及此多核苷酸和多肽的用途和制备。

背景技术

人类的先天性秃发、稀发常见于男性女性患者较为少见，虽然不影响人的生存质量，但是对于个人来讲由其是女性这种先天性的遗传疾病严重影响其生活质量，遗憾的是迄今为止没有可以从根本上治疗的方法。此外，搜集人类的先天性秃发家系存在较大的困难。

然而，目前还没有发现或分离出与秃发有关的基因。因此，本领域迫切需要开发新的新的与秃发有关的蛋白。

发明内容

本发明的目的是提供一种新的秃发相关蛋白-Rhor蛋白以及其片段、类似物和衍生物。

本发明的另一目的是提供编码这些多肽的多核苷酸。

本发明的另一目的是提供生产这些多肽的方法以及该多肽和编码序列的用途。

在本发明的第一方面，提供新颖的分离出的Rhor多肽，它包含：具有SEQ ID NO: 2氨基酸序列的多肽、或其保守性变异多肽、或其活性片段、或其活性衍生物。较佳地，该多肽是具有SEQ ID NO: 2氨基酸序列的多肽。

在本发明的第二方面，提供编码分离的这些多肽的多核苷酸，该多核苷酸包含一核苷酸序列，该核苷酸序列与选自下组的一种核苷酸序列有至少70%相同性：(a) 编码上述Rhor多肽的多核苷酸；和(b)与多核苷酸(a)互补的多核苷酸。较佳地，该多核苷酸编码具有SEQ ID NO: 2所示氨基酸序列的多肽。更佳地，该多核苷酸的序列具有SEQ ID NO: 1中1-2484位的序列。

在本发明的第三方面，提供了含有上述多核苷酸的载体，以及被该载体转化或转导的宿主细胞或者被上述多核苷酸直接转化或转导的宿主细胞。

在本发明的第四方面，提供了制备Rhor蛋白的方法，该方法包含：(a)在表达Rhor蛋白的条件下，培养上述被转化或转导的宿主细胞；(b)从培养物中分离出Rhor蛋白。

在本发明的第五方面，提供了与上述的Rhor多肽特异性结合的抗体。还提供了可用于检测的核酸分子，它含有上述的多核苷酸中连续的20-2484个核苷酸。

在本发明的第六方面，提供了模拟、促进、拮抗Rhor多肽活性的化合物，以及抑制Rhor多肽的表达的化合物。还提供了筛选和/或制备这些化合物的方法。较佳地，该化合物是Rhor多肽的编码序列或其片段的反义序列。

在本发明的第七方面，提供了检测样品中是否存在Rhor蛋白的方法，它包括：将样品与Rhor蛋白的特异性抗体接触，观察是否形成抗体复合物，形成了抗体复合物就表示样品中存在Rhor蛋白。

在本发明的第八方面，提供了一种检测与Rhor多肽异常表达相关的疾病或疾病(如秃发)易感性的方法，该方法包括：检测编码所述多肽的核酸序列中是否存在突变。较佳地，所述的突变是缺失了SEQ ID NO: 1中351—580的核苷酸序列。此外，还提供了相应的试剂盒，它包括特异性扩增Rhor基因或转录本的引物。较佳地，所述试剂盒还含有与突变部位结合的探针。

在本发明的第九方面，提供了本发明多肽和编码序列的用途。例如本发明多肽可被用于筛选促进Rhor多肽活性的激动剂，或者筛选抑制Rhor多肽活性的拮抗剂、或者被用于肽指纹图谱鉴定。本发明的Rhor蛋白的编码序列或其片段，可被作为引物用于PCR扩增反应，或者作为探针用于杂交反应，或者用于制造基因芯片或微阵列。

在本发明的第十方面，提供了一种药物组合物，它含有安全有效量的本发明的Rhor多肽或其激动剂、拮抗剂以及药学上可接受的载体。这些药物组合物可治疗秃发等病症。

本发明的其它方面由于本文的技术的公开，对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

图1是不同小鼠的Rhor基因片段的PCR扩增结果。其中泳道1：无毛小鼠；2：稀毛小鼠；3和4：正常小鼠。

具体实施方式

本发明人经过深入而广泛的研究，首次分离和证明了一种新基因Rhor与秃发

密切相关，该基因编码类似表皮生长因子受体的蛋白。Rhor的突变或功能下降或缺失将直接导致秃发。在此基础上完成了本发明。

在本发明中，术语“Rhor蛋白”、“Rhor多肽”或“秃发相关蛋白Rhor”可
5 互换使用，都指具有秃发相关蛋白Rhor氨基酸序列(SEQ ID NO:2)的蛋白或多肽。它们包括含有或不含起始甲硫氨酸的Rhor蛋白。

如本文所用，“分离的”是指物质从其原始环境中分离出来(如果是天然的物质，原始环境即是天然环境)。如活体细胞内的天然状态下的多聚核苷酸和多肽是没有分离纯化的，但同样的多聚核苷酸或多肽如从天然状态中同存在的其他物质中
10 分开，则为分离纯化的。

如本文所用，“分离的Rhor蛋白或多肽”是指Rhor多肽基本上不含天然与其相关的其它蛋白、脂类、糖类或其它物质。本领域的技术人员能用标准的蛋白质纯化技术纯化Rhor蛋白。基本上纯的多肽在非还原聚丙烯酰胺凝胶上能产生单一的主带。

15 本发明的多肽可以是重组多肽、天然多肽、合成多肽，优选重组多肽。本发明的多肽可以是天然纯化的产物，或是化学合成的产物，或使用重组技术从原核或真核宿主(例如，细菌、酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞)中产生。根据重组生产方案所用的宿主，本发明的多肽可以是糖基化的，或可以是非糖基化的。

本发明还包括Rhor蛋白的片段、衍生物和类似物。如本文所用，术语“片
20 段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明的天然Rhor蛋白相同的生物学功能或活性的多肽。本发明的多肽片段、衍生物或类似物可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽，而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的，或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽，或(iii)成熟多肽与另一个化合物(比如延长多肽半衰期的
25 化合物，例如聚乙二醇)融合所形成的多肽，或(iv)附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽(如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或蛋白原序列，或与抗原IgG片段的形成的融合蛋白)。根据本文的教导，这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

在本发明中，术语“Rhor多肽”指具有Rhor蛋白活性的SEQ ID NO: 2序列的
30 多肽。该术语还包括具有与Rhor蛋白相同功能的、SEQ ID NO: 2序列的变异形式。这些变异形式包括(但并不限于): 若干个(通常为1-50个，更佳地1-30个，更佳地1-20个，最佳地1-10个)氨基酸的缺失、插入和/或取代，以及在C末端和/或N末端添加一个或数个(通常为20个以内，更佳地为10个以内，更佳地为5个以内)氨基酸。

例如，在本领域中，用性能相近或相似的氨基酸进行取代时，通常不会改变蛋白质的功能。又比如，在C末端和/或N末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。该术语还包括Rhor蛋白的活性片段和活性衍生物。

该多肽的变异形式包括：同源序列、保守性变异体、等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严紧度条件下能与Rhor DNA 杂交的DNA所编码的蛋白、以及利用抗Rhor多肽的抗血清获得的多肽或蛋白。本发明还提供了其他多肽，如包含Rhor多肽或其片段的融合蛋白。除了几乎全长的多肽外，本发明还包括了Rhor多肽的可溶性片段。通常，该片段具有Rhor多肽序列的至少约10个连续氨基酸，通常至少约30个连续氨基酸，较佳地至少约50个连续氨基酸，更佳地至少约80个连续氨基酸，最佳地至少约100个连续氨基酸。

发明还提供Rhor蛋白或多肽的类似物。这些类似物与天然Rhor多肽的差别可以是氨基酸序列上的差异，也可以是不影响序列的修饰形式上的差异，或者兼而有之。这些多肽包括天然或诱导的遗传变异体。诱导变异体可以通过各种技术得到，如通过辐射或暴露于诱变剂而产生随机诱变，还可通过定点诱变法或其他已知分子生物学的技术。类似物还包括具有不同于天然L-氨基酸的残基(如D-氨基酸)的类似物，以及具有非天然存在的或合成的氨基酸(如 β 、 γ -氨基酸)的类似物。应理解，本发明的多肽并不限于上述列举的代表性的多肽。

修饰(通常不改变一级结构)形式包括：体内或体外的多肽的化学衍生形式如乙酰化或羧基化。修饰还包括糖基化，如那些在多肽的合成和加工中或进一步加工步骤中进行糖基化修饰而产生的多肽。这种修饰可以通过将多肽暴露于进行糖基化的酶(如哺乳动物的糖基化酶或去糖基化酶)而完成。修饰形式还包括具有磷酸化氨基酸残基(如磷酸酪氨酸，磷酸丝氨酸，磷酸苏氨酸)的序列。还包括被修饰从而提高了其抗蛋白水解性能或优化了溶解性能的多肽。

在本发明中，“Rhor蛋白保守性变异多肽”指与SEQ ID NO: 2的氨基酸序列相比，有至多10个，较佳地至多8个，更佳地至多5个，最佳地至多3个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表1进行氨基酸替换而产生。

表 1

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser

Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

本发明的多核苷酸可以是DNA形式或RNA形式。DNA形式包括cDNA、基因组DNA或人工合成的DNA。DNA可以是单链的或是双链的。DNA可以是编码链或非编码链。编码成熟多肽的编码区序列可以与SEQ ID NO:1所示的编码区序列相同或者是简并的变异体。如本文所用, “简并的变异体”在本发明中是指编码具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的蛋白质, 但与SEQ ID NO:1所示的编码区序列有差别的核酸序列。

编码成熟多肽的多核苷酸包括: 只编码成熟多肽的编码序列; 成熟多肽的编码序列和各种附加编码序列; 成熟多肽的编码序列(和任选的附加编码序列)以及非编码序列。

术语“编码多肽的多核苷酸”可以是包括编码此多肽的多核苷酸, 也可以是还包括附加编码和/或非编码序列的多核苷酸。

本发明还涉及上述多核苷酸的变异体, 其编码与本发明有相同的氨基酸序列的多肽或多肽的片段、类似物和衍生物。此多核苷酸的变异体可以是天然发生的等位变异体或非天然发生的变异体。这些核苷酸变异体包括取代变异体、缺失变异体和插入变异体。如本领域所知的, 等位变异体是一个多核苷酸的替换形式, 它可能是一个或多个核苷酸的取代、缺失或插入, 但不会从实质上改变其编码的多肽的功能。

本发明还涉及与上述的序列杂交且两个序列之间具有至少50%, 较佳地至少70%, 更佳地至少80%相同性的多核苷酸。本发明特别涉及在严格条件下与本发明

所述多核苷酸可杂交的多核苷酸。在本发明中，“严格条件”是指：(1)在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱，如 $0.2 \times \text{SSC}$ ， $0.1\% \text{SDS}$ ， 60°C ；或(2)杂交时加有变性剂，如 $50\%(\text{v/v})$ 甲酰胺， 0.1% 小牛血清/ $0.1\% \text{Ficoll}$ ， 42°C 等；或(3)仅在两条序列之间的相同性至少在 90% 以上，更好是 95% 以上时才发生杂交。并且，可杂交的多核苷酸编码的多肽与SEQ ID NO:2所示的成熟多肽有相同的生物学功能和活性。

本发明还涉及与上述的序列杂交的核酸片段。如本文所用，“核酸片段”的长度至少含15个核苷酸，较好是至少30个核苷酸，更好是至少50个核苷酸，最好是至少100个核苷酸以上。核酸片段可用于核酸的扩增技术(如PCR)以确定和/或分离编码Rhor蛋白的多聚核苷酸。

本发明中的多肽和多核苷酸优选以分离的形式提供，更佳地被纯化至均质。

本发明的Rhor核苷酸全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于PCR扩增法，可根据本发明所公开的有关核苷酸序列，尤其是开放阅读框序列来设计引物，并用市售的cDNA库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的cDNA库作为模板，扩增而得有关序列。当序列较长时，常常需要进行两次或多次PCR扩增，然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。

一旦获得了有关的序列，就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体，再转入细胞，然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

此外，还可用人工合成的方法来合成有关序列，尤其是片段长度较短时。通常，通过先合成多个小片段，然后再进行连接可获得序列很长的片段。

目前，已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白(或其片段，或其衍生物)的DNA序列。然后可将该DNA序列引入本领域中已知的各种现有的DNA分子(或如载体)和细胞中。此外，还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

应用PCR技术扩增DNA/RNA的方法被优选用于获得本发明的基因。用于PCR的引物可根据本文所公开的本发明的序列信息适当地选择，并可用常规方法合成。可用常规方法如通过凝胶电泳分离和纯化扩增的DNA/RNA片段。

本发明也涉及包含本发明的多核苷酸的载体，以及用本发明的载体或Rhor蛋白编码序列经基因工程产生的宿主细胞，以及经重组技术产生本发明所述多肽的方法。

通过常规的重组DNA技术(Science, 1984; 224: 1431)，可利用本发明的多聚核苷酸序列可用来表达或生产重组的Rhor多肽。一般来说有以下步骤：

(1).用本发明的编码Rhor多肽的多核苷酸(或变体)，或用含有该多核苷酸的重组表达载体转化或转导合适的宿主细胞；

(2).在合适的培养基中培养的宿主细胞；

(3).从培养基或细胞中分离、纯化蛋白质。

本发明中，Rhor多核苷酸序列可插入到重组表达载体中。术语“重组表达载体”指本领域熟知的细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒如腺病毒、逆转录病毒或其他载体。在本发明中适用的载体包括但不限于：在细菌中表达的基于T7的表达载体(Rosenberg, et al. Gene, 1987, 56:125); 在哺乳动物细胞中表达的pMSXND表达载体(Lee and Nathans, J Bio Chem. 263:3521,1988)和在昆虫细胞中表达的来源于杆状病毒的载体。总之，只要能在宿主体内复制和稳定，任何质粒和载体都可以用。表达载体的一个重要特征是通常含有复制起点、启动子、标记基因和翻译控制元件。

本领域的技术人员熟知的方法能用于构建含Rhor编码DNA序列和合适的转录/翻译控制信号的表达载体。这些方法包括体外重组DNA技术、DNA合成技术、体内重组技术等(Sambrook, et al. Molecular Cloning, a Laboratory Manual, cold Spring Harbor Laboratory. New York, 1989)。所述的DNA序列可有效连接到表达载体中的适当启动子上，以指导mRNA合成。这些启动子的代表性例子有：大肠杆菌的lac或trp启动子；λ噬菌体PL启动子；真核启动子包括CMV立即早期启动子、HSV胸苷激酶启动子、早期和晚期SV40启动子、反转录病毒的LTRs和其他一些已知的可控基因在原核或真核细胞或其病毒中表达的启动子。表达载体还包括翻译起始用的核糖体结合位点和转录终止子。

此外，表达载体优选地包含一个或多个选择性标记基因，以提供用于选择转化的宿主细胞的表型性状，如真核细胞培养用的二氢叶酸还原酶、新霉素抗性以及绿色荧光蛋白(GFP)，或用于大肠杆菌的四环素或氨苄青霉素抗性。

包含上述的适当DNA序列以及适当启动子或者控制序列的载体，可以用于转化适当的宿主细胞，以使其能够表达蛋白质。

宿主细胞可以是原核细胞，如细菌细胞；或是低等真核细胞，如酵母细胞；或是高等真核细胞，如哺乳动物细胞。代表性例子有：大肠杆菌，链霉菌属；鼠伤寒沙门氏菌的细菌细胞；真菌细胞如酵母；植物细胞；果蝇S2或Sf9的昆虫细胞；CHO、COS、293细胞、或Bowes黑素瘤细胞的动物细胞等。

本发明的多核苷酸在高等真核细胞中表达时，如果在载体中插入增强子序列时将会使转录得到增强。增强子是DNA的顺式作用因子，通常大约有10到300个碱基对，作用于启动子以增强基因的转录。可举的例子包括在复制起始点晚期一侧的100到270个碱基对的SV40增强子、在复制起始点晚期一侧的多瘤增强子以及腺病毒增强子等。

本领域一般技术人员都清楚如何选择适当的载体、启动子、增强子和宿主细胞。

用重组DNA转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时，能吸收DNA的感受态细胞可在指数生长期后收获，用CaCl₂法处理，所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用MgCl₂。如果需要，转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物，可选用如下的DNA转染方法：磷酸钙共沉淀法，常规机械方法如显微注射、电穿孔、脂质体包装等。

获得的转化子可以用常规方法培养，表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主细胞，培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后，用合适的方法(如温度转换或化学诱导)诱导选择的启动子，将细胞再培养一段时间。

在上面的方法中的重组多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要，可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但不限于：常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

重组的Rhor蛋白或多肽有多方面的用途。这些用途包括(但不限于)：直接做为药物治疗Rhor蛋白功能低下或丧失所致的疾病(如无精子，或精子活力低下等疾病)，和用于筛选促进或对抗Rhor蛋白功能的抗体、多肽或其它配体。用表达的重组Rhor蛋白筛选多肽库可用于寻找有治疗价值的能抑制或刺激Rhor蛋白功能的多肽分子。

另一方面，本发明还包括对Rhor DNA或是其片段编码的多肽具有特异性的多克隆抗体和单克隆抗体，尤其是单克隆抗体。这里，“特异性”是指抗体能结合于Rhor基因产物或片段。较佳地，指那些能与Rhor基因产物或片段结合但不识别和结合于其它非相关抗原分子的抗体。本发明中抗体包括那些能够结合并抑制Rhor蛋白的分子，也包括那些并不影响Rhor蛋白功能的抗体。本发明还包括那些能与修饰或未经修饰形式的Rhor基因产物结合的抗体。

本发明不仅包括完整的单克隆或多克隆抗体，而且还包括具有免疫活性的抗体片段，如Fab'或(Fab)₂片段；抗体重链；抗体轻链；遗传工程改造的单链Fv分子；或嵌合抗体，如具有鼠抗体结合特异性但仍保留来自人的抗体部分的抗体。

本发明的抗体可以通过本领域内技术人员已知的各种技术进行制备。例如，纯化的Rhor基因产物或者其具有抗原性的片段，可被施用于动物以诱导多克隆抗体的产生。与之相似的，表达Rhor蛋白或其具有抗原性的片段的细胞可用来免疫动物来生产抗体。本发明的抗体也可以是单克隆抗体。此类单克隆抗体可以利用杂交瘤技术来制备。本发明的抗体包括能阻断Rhor蛋白功能的抗体以及不影响Rhor蛋白功能

的抗体。本发明的各类抗体可以利用Rhor基因产物的片段或功能区，通过常规免疫技术获得。这些片段或功能区可以利用重组方法制备或利用多肽合成仪合成。与Rhor基因产物的未修饰形式结合的抗体可以用原核细胞(例如*E. Coli*)中生产的基因产物来免疫动物而产生；与翻译后修饰形式结合的抗体(如糖基化或磷酸化的蛋白或多肽)，可以用真核细胞(例如酵母或昆虫细胞)中产生的基因产物来免疫动物而获得。

抗Rhor蛋白的抗体可用于免疫组织化学技术中，检测活检标本中的Rhor蛋白。此外，与Rhor蛋白结合的单克隆抗体也可用放射性同位素标记，注入体内可跟踪其位置和分布。

多克隆抗体的生产可用Rhor蛋白或多肽免疫动物，如家兔，小鼠，大鼠等。多种佐剂可用于增强免疫反应，包括但不限于弗氏佐剂等。

利用本发明蛋白，通过各种常规筛选方法，可筛选出与Rhor蛋白发生相互作用的物质，如受体、抑制剂、激动剂或拮抗剂等。

本发明蛋白及其抗体、抑制剂、激动剂、拮抗剂或受体等，当在治疗上进行施用(给药)时，可提供不同的效果。通常，可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中，其中pH通常约为5-8，较佳地pH约为6-8，尽管pH值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药，其中包括(但并不限于)：口服、肌内、腹膜内、静脉内、皮下、皮内、或局部给药。

本发明的多肽可直接用于疾病治疗，例如，用于秃发的治疗。在使用本发明Rhor蛋白时，还可同时使用其他用于同一病症的治疗剂。

本发明还提供了一种药物组合物，它含有安全有效量的本发明Rhor多肽或其激动剂、拮抗剂以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但并不限于)：盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式，例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。诸如片剂和胶囊之类的药物组合物，可通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液、片剂和胶囊宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量，例如每天约1微克/千克体重-约5毫克/千克体重。此外，本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

使用药物组合物时，是将安全有效量的Rhor蛋白或其拮抗剂、激动剂施用于哺乳动物，其中该安全有效量通常至少约10微克/千克体重，而且在大多数情况下不超过约5毫克/千克体重，较佳地该剂量是约10微克/千克体重-约1毫克/千克体重。当然，具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素，这些都是熟练医师技能范围内的。

Rhor蛋白的多聚核苷酸也可用于多种治疗目的。基因治疗技术可用于治疗由于Rhor蛋白的无表达或异常/无活性的Rhor蛋白的表达所致的秃发。来源于病毒的表达载体如逆转录病毒、腺病毒、腺病毒相关病毒、单纯疱疹病毒、细小病毒等可用于将Rhor基因转移至细胞内。另外重组Rhor基因可包装到脂质体中，然后再转移至细胞内。

多聚核苷酸导入组织或细胞内的方法包括：将多聚核苷酸直接注入到体内组织中；或在体外通过载体(如病毒、噬菌体或质粒等)先将多聚核苷酸导入细胞中，再将细胞移植到体内等。

能与Rhor蛋白结合的多肽分子可通过筛选由各种可能组合的氨基酸结合于固相物组成的随机多肽库而获得。筛选时，必须对Rhor蛋白分子进行标记。

本发明还涉及定量和定位检测Rhor蛋白水平的诊断试验方法。这些试验是本领域所熟知的，且包括FISH测定和放射免疫测定。试验中所检测的Rhor蛋白水平，可以用作解释Rhor蛋白在各种疾病中的重要性和用于诊断Rhor蛋白起作用的疾病(如秃发)。

一种检测检测样品中是否存在Rhor蛋白的方法是利用Rhor蛋白的特异性抗体进行检测，它包括：将样品与Rhor蛋白特异性抗体接触；观察是否形成抗体复合物，形成了抗体复合物就表示样品中存在Rhor蛋白。

Rhor蛋白的多聚核苷酸可用于Rhor蛋白相关疾病的诊断和治疗。在诊断方面，Rhor蛋白的多聚核苷酸可用于检测Rhor蛋白的表达与否或在疾病状态下Rhor蛋白的异常表达。如Rhor DNA序列可用于对活检标本的杂交以判断Rhor蛋白的表达异常。杂交技术包括Southern印迹法、Northern印迹法、原位杂交等。这些技术方法都是公开的成熟技术，相关的试剂盒都可从商业途径得到。本发明的多核苷酸的一部分或全部可作为探针固定在微阵列(microarray)或DNA芯片(又称为“基因芯片”)上，用于分析组织中基因的差异表达分析和基因诊断。用Rhor蛋白特异的引物进行RNA-聚合酶链反应(RT-PCR)体外扩增也可检测Rhor蛋白的转录产物。

检测Rhor基因的突变也可用于诊断Rhor蛋白相关的疾病。Rhor蛋白突变的形式包括与正常野生型Rhor DNA序列相比的点突变、易位、缺失、重组和其它任何异常等。可用已有的技术如Southern印迹法、DNA序列分析、PCR和原位杂交检测突变。另外，突变有可能影响蛋白的表达，因此用Northern印迹法、Western印迹法可间接判断基因有无突变。本发明的试验已表明，Rhor的突变与秃发直接相关。

在本发明的一个实例中，根据无毛、稀毛和正常小鼠的表型和遗传分析等手段，确定了一个从未被报导过的新基因，并分离了相应的多核苷酸序列，它编码具有SEQ ID NO: 2所示氨基酸序列的多肽。本发明的多核苷酸的序列如SEQ ID NO: 1

所示，它包含的多核苷酸序列全长为2484个碱基，其开放读框位于1-2481位，编码全长为827个氨基酸的Rhor蛋白(SEQ ID NO: 2)。研究表明，该基因的突变可能阻断了信号的传导，影响了毛囊细胞的发育，从而导致了小鼠的先天性无毛。由于该蛋白的编码区存在高度的保守性，因此人类基因组内该基因的部分缺失极有可能导致人类的先天性秃发、稀发。Rhor为治疗秃发等疾病提供新的治疗途径，因而具有巨大的应用前景。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如Sambrook等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

实施例1

无毛相关基因的定位

正常小鼠Balb/c在培养中产生了先天性无毛的突变，杂合子表型为稀毛，纯合子表型为无毛。无毛小鼠与正常小鼠的杂交后代无一例外的表现为稀毛。稀毛小鼠自交后代出现了性状分离且符合典型的孟德尔单基因遗传规律，其比例符合计算值即：正常：稀毛：无毛=1：2：1。此外，根据其系谱确定该种突变是单基因的不完全显性。

为了检测该种突变，抽提2000只小鼠的基因组DNA进行genotyping 所得的数据用计算机进行分析，所用软件为Linkage，将突变定位于微卫星标记D11mit103和D11mit338之间，它们的物理距离为1700kb，随后构建了该区域精细的物理图谱，进一步将突变定位到了800kb的区域，然后对该区域内的基因进行基于直接测序方法的全基因扫描。从而将突变位点定位位于一个较小的区域内。

实施例2

基因组DNA缺失的鉴定：

用分子克隆中所述的标准方法从无毛、稀毛和正常Balb/c小鼠组织中抽提基因组DNA，使用以下合成引物

正向引物：5' gcaggctagcgtgttaaagg 3'(SEQ ID NO:3)

反向引物：5' aaaacgggggtcatagcagc 3' (SEQ ID NO:4)

以基因组DNA为模板使用ABI公司的TaqGold 高温聚合酶进行PCR扩增，PCR

热循环条件是：

高温聚合酶热启动，模板变性：95℃ 10分钟

第一轮热循环

95℃ 30秒

68℃ 45秒

每一次循环降低一度

72℃ 2分30秒

循环 12 次

第二轮热循环

95℃ 30秒

56℃ 45秒

72℃ 2分30秒

循环35次

72℃ 10 分钟

产物进行1.0%琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭染色结果如图1所示。杂合稀毛小鼠的基因组扩增产物为两条特异性条带其分子量与无毛和正常小鼠的扩增产物分别吻合。

实施例3

Rhor的基因组测序

本实施例进一步通过基因组测序的方法，验证Rhor与无毛的相关性。方法如下：

用Omega公司的 Cycle-Pure Kit纯化上述无毛与正常小鼠基因组PCR 产物，其中使用以下合成引物

正向引物： 5' gcacatctgagggaaggaag 3'(SEQ ID NO: 5)

反向引物： 5' .cttccgggtcaaagtcaaagt 3'(SEQ ID NO: 6)

用ABI公司的BigDye terminal试剂及3100全自动测序仪，测序反应条件是：

模板变性 98度 2分

96度 20秒

51度 20秒

60度 4分
循环 25 次

测序结果如下所示:

5 AGCCTACCTG AAGAGTGTCA GCCTACAGGA GCCCCGGGGA CGATGGCAGG AGGGCGCAGA 60
GAAGCGCCCC GGCTTCCGCC GCCAGGCCTC CCTGTCCCAG AGCATCCGCA AGAGCACAGC 120
CCAGTGGTTT GGGGTCAGCG GCGACTGGGA GGGCAAGCGA CAAAACTGGC ATCGTCGCAG 180
CCTGCACCAC TGCAGCGTGC ACTATGGCCG CCTCAAGGCC TCGTGCCAGA GAGAACTGGA 240
GCTGCCCAGC CAGGAGGTGC CATCCTTCCA GGGCACTGAG TCTCCAAAAC CGTGCAAGAT 300
10 GCCCAAGATT GTGGATCCAC TGGCTCGGGG TAGGGCCTTC CGCCATCCAG ATGAGGTGGA 360
CCGGCCTCAC GCTGCCCACC CACCTCTGAC TCCAGGGGTC CTGTCTCTCA CATCCTTCAC 420
CATGTCCGCT CTGGCTACTC CCATCTGCCC CGCCGCAAGA GGATATCTGT TGCCCATATG 480
AGCTTTCAGG CAGCCGCCGC CCTCCTCAAG GGGCGTTCCG TGCTAGATGC GACTGGGCAG 540
CGGTGCCGGC ATGTCAAACG CAGCTTCGCT TACCCAGCT TCCTGGAGGA GGATGCTGTC 600
15 (SEQ ID NO: 7)

将正常小鼠的序列与无毛小鼠的序列比较可发现, 无毛小鼠的基因组发生了230碱基的缺失(下划线部分)。

20 实施例4

Rhor基因完整开放阅读框架的获得

按照 Qiagen 公司的 Total Rna 纯化试剂盒提供的方法抽提小鼠皮肤总RNA, 1%琼脂糖电泳鉴定纯度后用 Promega 公司的 Reverse Transcript System 将RNA反转录为cDNA. 后用以下引物:

25 正向引物: 5' ACTCTGCTCTCAGCCGCTT 3' (SEQ ID NO: 8)
反向引物: 5' CCAGACACATGCTGGAGCTA 3' (SEQ ID NO: 9)
使用 Takara 公司的 LA 高温聚合酶
PCR 热循环条件:
95 度 30 秒
30 54 度 45 秒
72 度 3分
循环 45 次

72度 10分钟

0.8% 琼脂糖电泳分离，割胶纯化，测序鉴定，得到Rhor的完整ORF全长序列。

Rhor基因的完整开放阅读框架如SEQ ID NO:1所示。其编码蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

实施例5

Rhor基因cDNA缺失的鉴定方法

使用上述方法获得的无毛及正常小鼠cDNA为模板，使用ABI公司的GoldTaq高温聚合酶。引物如下：

正向引物：5' gcacatctgaggggaaggaag 3'(SEQ ID NO: 10)

反向引物：5' cttccggtcaaatacaaagt 3' (SEQ ID NO: 11)

PCR热循环条件

模板热变性，高温聚合酶热启动 95度 10分

第一轮热循环

95 度 30秒

68 度 45秒

每一循环降低1度

72度 90秒

循环14 次

第二轮热循环

95度 30秒

54度 45秒

72度 90秒

循环40次

72度 10分

0.8%琼脂糖电泳鉴定后用Omega公司的Cycle-Pure Kit 纯化产物，用ABI公司的BigDye terminal 仍用上述引物测序，测序反应：

模板变性 98度 2分

96 度 20秒

51度 20秒

60度 4分

循环 25 次

结果如下

5 GTGTCAGCCT ACAGGAGCCC CGGGGACGAT GGCAGGAGGG CGCAGAGAAG CGCCCCGGCT 60
TCCGCCGCCA GGCCTCCCTG TCCCAGAGCA TCCGCAAGAG CACAGCCCAG TGGTTTGGGG 120
TCAGCGGCGA CTGGGAGGGC AAGCGACAAA ACTGGCATCG TCGCAGCCTG CACCACTGCA 180
GCGTGCACTA TGGCCGCCTC AAGGCCTCGT GCCAGAGAGA ACTGGAGCTG CCCAGCCAGG 240
AGGTGCCATC CTTCCAGGGC ACTGAGTCTC CAAAACCGTG CAAGATGCCC AAGATTGTGG 300
ATCCAATGGC TCGGGGTAGG GCCTTCCGCC ATCCAGATGA GGTGGACCGG CCTCACGCTG 360
10 CCCACCCACC TCTGACTCCA GGGGTCTGT CTCTCACATC CTTCACCATG TCCGCTCTGG 420
CTACTCCCAT CTGCCCCGCC GCAAGAGGAT ATCTGTTGCC CATATGAGCT TTCAGGCAGC 480
CGCCGCCCTC CTCAAGGGGC GTTCCGTGCT AGATGCGACT GGGCAGCGGT GCCGGCATGT 540
CAAACGCAGC TTCGTTACC CCAGCTTCCT GGAGGAGGAT GCTGTGATG GAGCTGACAC 600
(SEQ ID NO: 12)

15 其中，下划线部分为无毛小鼠与正常小鼠比较后发生缺失的序列。其中cDNA序列中的缺失部分与基因组序列中的缺失部分相同。

实施例6

Rhor 的结构分析

20 通过结构分析，发现 Rhor 基因编码的蛋白序列包含了二个非常保守的结构域：

(1) Rhor 蛋白的氨基酸 619—759 位形成一个 Rhomboid 结构域。这表明，Rhor 蛋白属于 Rhomboid 蛋白家族成员，该家族成员在细菌和真核生物中都有报道，大部分是完整的膜蛋白，它们预测跨膜区存在三个高度保守的组氨酸。

25 (2) Rhor 蛋白的氨基酸 610—804 位形成一个 competence 结构域。这表明，它属于 competence 蛋白家族成员，该家族成员是完整的膜蛋白，它们具有 6 个跨膜的螺旋结构，这些蛋白行使跨膜运输核酸的功能。一些家族成员曾被报导在细菌吸收细胞外 DNA 功能中起了关键的作用。该家族成员有一个氨基末端的跨膜区，该区内两个组氨酸形成一个高度保守的结构单元 (motif) 作为金属离子结合位点。

30 上述结构分析提示，Rhor 蛋白的突变可能使其失去了跨核膜运输信使 RNA (mRNA) 的功能，从而阻断了毛囊细胞的发育。

实施例7

Rhor 的其他功能

除了无毛之外，还发现无毛小鼠普遍较正常小鼠要消瘦，在解剖的过程中发现其脂肪储备几乎不可见。这表明，认为Rhor基因也参与了脂肪代谢通路的调节，它的突变导致了脂代谢的紊乱。

此外，无毛小鼠在生长过程中出现了淋巴瘤，Rhor基因的突变会导致淋巴细胞的生长失去正常调控。这暗示Rhor有可能处于多个代谢途径的调控点。

实施例 8

Rhor在原核细胞中的表达

合成以下引物：

10 正向引物： 5'CGGATCCATGGCCTCAGCTGACAAGAATGGCAGCAACCTCCCA
3'(SEQ ID NO:13) (引入BamHI 切点GGATCC, 第一个C为保护碱基)

反向引物： 5'ATAAAGCTTGCTCGATCTGGTCCACGATGTGATT 3'(SEQ ID NO:
14)(引入HindIII切点 AAGCTT, 起始ATA为保护碱基)

以小鼠cDNA为模板, PCR扩增编码Rhor蛋白的DNA。

15 利用 BamHI 和 Hind III 位点, 将PCR扩增产物克隆到相同酶切的质粒
pET32a (Novagen公司) 中, 然后转化宿主*E. Coli:BL21 (DE3)*。转化的宿主细胞在
IPTG的诱导下表达。

表达产物在SDS-PAGE胶中分子量大约为90Kda。

20 实施例9

抗体的制备

用实施例8中获得蛋白用作抗原, 在兔中制备多克隆抗体。具体程序如下：第
一次免疫纯种新西兰兔, 蛋白用量为240ug/只, 用弗氏完全佐剂。4周后, 第二次
免疫, 蛋白用量为140ug/只, 用不完全佐剂。之后2周, 第三次免疫, 蛋白用量为
25 120ug/只, 用不完全佐剂。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考, 就如同每一篇文献被单
独引用作为参考那样。此外应理解, 在阅读了本发明的上述讲授内容之后, 本领域
技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所附权利
30 要求书所限定的范围。

序列表

<110> 中国科学院上海生物工程研究中心

<120> 利用人和鼠 Rhor 基因及其编码产物诊断和治疗秃发的方法

<130> 026816

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2484

<212> DNA

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2481)

<223>

<400> 1

atg gcc tca gct gac aag aat ggc agc aac ctc cca tct gtg tct ggt	48
Met Ala Ser Ala Asp Lys Asn Gly Ser Asn Leu Pro Ser Val Ser Gly	
1 5 10 15	
agc cgc ctg cag agc cgg aag cca ccc aac ctc tcc atc atc atc ccg	96
Ser Arg Leu Gln Ser Arg Lys Pro Pro Asn Leu Ser Ile Thr Ile Pro	
20 25 30	
cca cca gag agc cag gcc ccc ggc gag cag gat agc atg ctt cct gag	144
Pro Pro Glu Ser Gln Ala Pro Gly Glu Gln Asp Ser Met Leu Pro Glu	
35 40 45	
agg cgc aag aac cca gcc tac ctg aag agt gtc agc cta cag gag ccc	192
Arg Arg Lys Asn Pro Ala Tyr Leu Lys Ser Val Ser Leu Gln Glu Pro	
50 55 60	
cgg gga cga tgg cag gag ggc gca gag aag cgc ccc ggc ttc cgc cgc	240
Arg Gly Arg Trp Gln Glu Gly Ala Glu Lys Arg Pro Gly Phe Arg Arg	
65 70 75 80	
cag gcc tcc ctg tcc cag agc atc cgc aag agc aca gcc cag tgg ttt	288
Gln Ala Ser Leu Ser Gln Ser Ile Arg Lys Ser Thr Ala Gln Trp Phe	
85 90 95	
ggg gtc agc ggc gac tgg gag ggc aag cga caa aac tgg cat cgt cgc	336
Gly Val Ser Gly Asp Trp Glu Gly Lys Arg Gln Asn Trp His Arg Arg	
100 105 110	
agc ctg cac cac tgc agc gtg cac tat ggc cgc ctc aag gcc tcg tgc	384
Ser Leu His His Cys Ser Val His Tyr Gly Arg Leu Lys Ala Ser Cys	
115 120 125	
cag aga gaa ctg gag ctg ccc agc cag gag gtg cca tcc ttc cag ggc	432
Gln Arg Glu Leu Glu Leu Pro Ser Gln Glu Val Pro Ser Phe Gln Gly	

130	135	140	
act gag tct cca aaa ccg tgc aag atg ccc aag att gtg gat cca ctg Thr Glu Ser Pro Lys Pro Cys Lys Met Pro Lys Ile Val Asp Pro Leu 145 150 155 160			480
gct cgg ggt agg gcc ttc cgc cat cca gat gag gtg gac cgg cct cac Ala Arg Gly Arg Ala Phe Arg His Pro Asp Glu Val Asp Arg Pro His 165 170 175			528
gct gcc cac cca cct ctg act cca ggg gtc ctg tct ctc aca tcc ttc Ala Ala His Pro Pro Leu Thr Pro Gly Val Leu Ser Leu Thr Ser Phe 180 185 190			576
acc agt gtc cgc tct ggc tac tcc cat ctg ccc cgc cgc aag agg ata Thr Ser Val Arg Ser Gly Tyr Ser His Leu Pro Arg Arg Lys Arg Ile 195 200 205			624
tct gtt gcc cat atg agc ttt cag gca gcc gcc gcc ctc ctc aag ggg Ser Val Ala His Met Ser Phe Gln Ala Ala Ala Leu Leu Lys Gly 210 215 220			672
cgt tcc gtg cta gat gcg act ggg cag cgg tgc cgg cat gtc aaa cgc Arg Ser Val Leu Asp Ala Thr Gly Gln Arg Cys Arg His Val Lys Arg 225 230 235 240			720
agc ttc gct tac ccc agc ttc ctg gag gag gat gct gtc gat gga gct Ser Phe Ala Tyr Pro Ser Phe Leu Glu Glu Asp Ala Val Asp Gly Ala 245 250 255			768
gac acc ttc gac tcc tcc ttt ttt agt aag gaa gaa atg agc tcc atg Asp Thr Phe Asp Ser Ser Phe Phe Ser Lys Glu Glu Met Ser Ser Met 260 265 270			816
cct gac gat gtc ttt gag tcc ccc cca ctc tct gcc agc tac ttc cga Pro Asp Asp Val Phe Glu Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ser Tyr Phe Arg 275 280 285			864
ggg gtc cca cac tct gcc tcc ccg gtc tcc ccg gat gga gtg cac atc Gly Val Pro His Ser Ala Ser Pro Val Ser Pro Asp Gly Val His Ile 290 295 300			912
ccg cta aaa gaa tac agc ggt ggc cga gcc ctg ggt ccc ggg acc cag Pro Leu Lys Glu Tyr Ser Gly Gly Arg Ala Leu Gly Pro Gly Thr Gln 305 310 315 320			960
cgt ggc aaa cgc att gcc tcc aaa gta aag cac ttt gca ttt gac cgg Arg Gly Lys Arg Ile Ala Ser Lys Val Lys His Phe Ala Phe Asp Arg 325 330 335			1008
aag aag agg cac tac ggc ctg ggt gtc gtg ggt aac tgg ctc aac cga Lys Lys Arg His Tyr Gly Leu Gly Val Val Gly Asn Trp Leu Asn Arg 340 345 350			1056
agc tat cga cgc agc atc agc agc acc gtg cag cgg cag ctg gag agc Ser Tyr Arg Arg Ser Ile Ser Ser Thr Val Gln Arg Gln Leu Glu Ser 355 360 365			1104

21

ttc gat agc cae cgg ccc tac ttc acc tac tgg ctg acg ttc gtt cac Phe Asp Ser His Arg Pro Tyr Phe Thr Tyr Trp Leu Thr Phe Val His 370 375 380	1152
atc atc atc acc ttg ctg gtg atc tgc acc tat ggc atc gca cct gtg Ile Ile Ile Thr Leu Leu Val Ile Cys Thr Tyr Gly Ile Ala Pro Val 385 390 395 400	1200
ggc ttt gcc cag cac gtt acc acc cag ctg gtg ctg aag aac aga ggc Gly Phe Ala Gln His Val Thr Thr Gln Leu Val Leu Lys Asn Arg Gly 405 410 415	1248
gtg tal gag agc gtg aag tac atc cag cag gag aac ttc tgg att ggc Val Tyr Glu Ser Val Lys Tyr Ile Gln Gln Glu Asn Phe Trp Ile Gly 420 425 430	1296
ccc agc tcg att gac ctc att cac ctg gga gca aag ttc tcg ccc tgc Pro Ser Ser Ile Asp Leu Ile His Leu Gly Ala Lys Phe Ser Pro Cys 435 440 445	1344
atc cgg aag gac cag caa att gag cag ctg gta cgg agg gag cgc gac Ile Arg Lys Asp Gln Gln Ile Glu Gln Leu Val Arg Arg Glu Arg Asp 450 455 460	1392
att gag cgc acc tct ggc tgc tgt gtc cag aat gac cgc tcg ggc tgc Ile Glu Arg Thr Ser Gly Cys Cys Val Gln Asn Asp Arg Ser Gly Cys 465 470 475 480	1440
atc cag acc ctg aag aag gac tgc tcg gag act tta gcc acg ttc gta Ile Gln Thr Leu Lys Lys Asp Cys Ser Glu Thr Leu Ala Thr Phe Val 485 490 495	1488
aag tgg cag aat gat act ggg ccc tca gac aag tct gac ctg agc cag Lys Trp Gln Asn Asp Thr Gly Pro Ser Asp Lys Ser Asp Leu Ser Gln 500 505 510	1536
aag cag cca tcg gcg gtt gtg tgc cac caa gac ccc agg acc tgt gaa Lys Gln Pro Ser Ala Val Val Cys His Gln Asp Pro Arg Thr Cys Glu 515 520 525	1584
gag cct gcc tcc agt ggg gcc cac atc tgg cct gat gac att acc aag Glu Pro Ala Ser Ser Gly Ala His Ile Trp Pro Asp Asp Ile Thr Lys 530 535 540	1632
tgg ccg atc tgc aca gag cag gct cag agc aac cac acg ggc ttg ttg Trp Pro Ile Cys Thr Glu Gln Ala Gln Ser Asn His Thr Gly Leu Leu 545 550 555 560	1680
cac ata gac tgt aag atc aaa ggc cgc ccc tgc tgc atc ggc acc aag His Ile Asp Cys Lys Ile Lys Gly Arg Pro Cys Cys Ile Gly Thr Lys 565 570 575	1728
ggc agc tgc gag atc acc act cgg gag tac tgt gag ttc atg cat ggc Gly Ser Cys Glu Ile Thr Thr Arg Glu Tyr Cys Glu Phe Met His Gly 580 585 590	1776
tat ttc cat gaa gac gcg acg ctg tgt tcc cag gtg cac tgt tta gac Tyr Phe His Glu Asp Ala Thr Leu Cys Ser Gln Val His Cys Leu Asp	1824

595	600	605	
aag gtg tgt ggg ctc ctg cct ttc ctc aac cct gag gtc cct gac cag Lys Val Cys Gly Leu Leu Pro Phe Leu Asn Pro Glu Val Pro Asp Gln 610 615 620			1872
ttc tac cgg atc tgg ctg tct tta ttc ctg cat gct ggc ata gtg cac Phe Tyr Arg Ile Trp Leu Ser Leu Phe Leu His Ala Gly Ile Val His 625 630 635 640			1920
tgc ctt gtg tct gtg gtc ttc caa atg acc atc ctg agg gac cta gag Cys Leu Val Ser Val Val Phe Gln Met Thr Ile Leu Arg Asp Leu Glu 645 650 655			1968
aag ctg gcc ggc tgg cac cgc atc tcc atc atc ttc atc ctt agt ggc Lys Leu Ala Gly Trp His Arg Ile Ser Ile Ile Phe Ile Leu Ser Gly 660 665 670			2016
att aca ggc aac ctg gcc agc gcc atc ttc ctc ccc tac cgg gca gag Ile Thr Gly Asn Leu Ala Ser Ala Ile Phe Leu Pro Tyr Arg Ala Glu 675 680 685			2064
gtg ggc cca gcc ggg tcg cag ttc ggc ctc ctc gcc tgc ctc ttc gtg Val Gly Pro Ala Gly Ser Gln Phe Gly Leu Leu Ala Cys Leu Phe Val 690 695 700			2112
gag ctg ttc cag agc tgg cag ctg ttg gag cgg ccg tgg aag gcc ttc Glu Leu Phe Gln Ser Trp Gln Leu Leu Glu Arg Pro Trp Lys Ala Phe 705 710 715 720			2160
ttc aac ctg tcg gcc att gtg ctt ttc ctc ttc atc tgt ggc ctc ctg Phe Asn Leu Ser Ala Ile Val Leu Phe Leu Phe Ile Cys Gly Leu Leu 725 730 735			2208
ccc tgg ata gac aac atc gcc cac atc ttc ggg ttc ctc agc ggc atg Pro Trp Ile Asp Asn Ile Ala His Ile Phe Gly Phe Leu Ser Gly Met 740 745 750			2256
ctt ctg gcc ttc gcc ttc ctg cct tac att acc ttc ggc acc agc gac Leu Leu Ala Phe Ala Phe Leu Pro Tyr Ile Thr Phe Gly Thr Ser Asp 755 760 765			2304
aag tac cgc aag cga gcc ctc atc ctc gtg tcg ctg ctg gtc ttt gct Lys Tyr Arg Lys Arg Ala Leu Ile Leu Val Ser Leu Leu Val Phe Ala 770 775 780			2352
ggg ctc ttt gct tcc ctg gtg ctg tgg ctg tac atc tac ccc atc aac Gly Leu Phe Ala Ser Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ile Tyr Pro Ile Asn 785 790 795 800			2400
tgg ccc tgg atc gag tac ctc acc tgc ttt ccc ttc acc agc cgc ttc Trp Pro Trp Ile Glu Tyr Leu Thr Cys Phe Pro Phe Thr Ser Arg Phe 805 810 815			2448
tgt gag aag tac gag cta gac cag gtg cta cac taa Cys Glu Lys Tyr Glu Leu Asp Gln Val Leu His 820 825			2484

25
<210> 2
<211> 827
<212> PRT
<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 2

Met Ala Ser Ala Asp Lys Asn Gly Ser Asn Leu Pro Ser Val Ser Gly
1 5 10 15

Ser Arg Leu Gln Ser Arg Lys Pro Pro Asn Leu Ser Ile Thr Ile Pro
20 25 30

Pro Pro Glu Ser Gln Ala Pro Gly Glu Gln Asp Ser Met Leu Pro Glu
35 40 45

Arg Arg Lys Asn Pro Ala Tyr Leu Lys Ser Val Ser Leu Gln Glu Pro
50 55 60

Arg Gly Arg Trp Gln Glu Gly Ala Glu Lys Arg Pro Gly Phe Arg Arg
65 70 75 80

Gln Ala Ser Leu Ser Gln Ser Ile Arg Lys Ser Thr Ala Gln Trp Phe
85 90 95

Gly Val Ser Gly Asp Trp Glu Gly Lys Arg Gln Asn Trp His Arg Arg
100 105 110

Ser Leu His His Cys Ser Val His Tyr Gly Arg Leu Lys Ala Ser Cys
115 120 125

Gln Arg Glu Leu Glu Leu Pro Ser Gln Glu Val Pro Ser Phe Gln Gly
130 135 140

Thr Glu Ser Pro Lys Pro Cys Lys Met Pro Lys Ile Val Asp Pro Leu
145 150 155 160

Ala Arg Gly Arg Ala Phe Arg His Pro Asp Glu Val Asp Arg Pro His
165 170 175

Ala Ala His Pro Pro Leu Thr Pro Gly Val Leu Ser Leu Thr Ser Phe
180 185 190

Thr Ser Val Arg Ser Gly Tyr Ser His Leu Pro Arg Arg Lys Arg Ile
195 200 205

Ser Val Ala His Met Ser Phe Gln Ala Ala Ala Leu Leu Lys Gly
210 215 220

Arg Ser Val Leu Asp Ala Thr Gly Gln Arg Cys Arg His Val Lys Arg
225 230 235 240

Ser Phe Ala Tyr Pro Ser Phe Leu Glu Glu Asp Ala Val Asp Gly Ala
245 250 255

Asp Thr Phe Asp Ser Ser Phe Phe Ser Lys Glu Glu Met Ser Ser Met
260 265 270

Pro Asp Asp Val Phe Glu Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ser Tyr Phe Arg
275 280 285

Gly Val Pro His Ser Ala Ser Pro Val Ser Pro Asp Gly Val His Ile
290 295 300

Pro Leu Lys Glu Tyr Ser Gly Gly Arg Ala Leu Gly Pro Gly Thr Gln
305 310 315 320

Arg Gly Lys Arg Ile Ala Ser Lys Val Lys His Phe Ala Phe Asp Arg
325 330 335

Lys Lys Arg His Tyr Gly Leu Gly Val Val Gly Asn Trp Leu Asn Arg
340 345 350

Ser Tyr Arg Arg Ser Ile Ser Ser Thr Val Gln Arg Gln Leu Glu Ser
355 360 365

Phe Asp Ser His Arg Pro Tyr Phe Thr Tyr Trp Leu Thr Phe Val His
370 375 380

Ile Ile Ile Thr Leu Leu Val Ile Cys Thr Tyr Gly Ile Ala Pro Val
385 390 395 400

Gly Phe Ala Gln His Val Thr Thr Gln Leu Val Leu Lys Asn Arg Gly
405 410 415

Val Tyr Glu Ser Val Lys Tyr Ile Gln Gln Glu Asn Phe Trp Ile Gly
420 425 430

Pro Ser Ser Ile Asp Leu Ile His Leu Gly Ala Lys Phe Ser Pro Cys
435 440 445

Ile Arg Lys Asp Gln Gln Ile Glu Gln Leu Val Arg Arg Glu Arg Asp
450 455 460

Ile Glu Arg Thr Ser Gly Cys Cys Val Gln Asn Asp Arg Ser Gly Cys
465 470 475 480

Ile Gln Thr Leu Lys Lys Asp Cys Ser Glu Thr Leu Ala Thr Phe Val
485 490 495

Lys Trp Gln Asn Asp Thr Gly Pro Ser Asp Lys Ser Asp Leu Ser Gln
500 505 510

Lys Gln Pro Ser Ala Val Val Cys His Gln Asp Pro Arg Thr Cys Glu
515 520 525

Glu Pro Ala Ser Ser Gly Ala His Ile Trp Pro Asp Asp Ile Thr Lys
530 535 540

Trp Pro Ile Cys Thr Glu Gln Ala Gln Ser Asn His Thr Gly Leu Leu
545 550 555 560

His Ile Asp Cys Lys Ile Lys Gly Arg Pro Cys Cys Ile Gly Thr Lys
565 570 575

Gly Ser Cys Glu Ile Thr Thr Arg Glu Tyr Cys Glu Phe Met His Gly
580 585 590

Tyr Phe His Glu Asp Ala Thr Leu Cys Ser Gln Val His Cys Leu Asp
595 600 605

Lys Val Cys Gly Leu Leu Pro Phe Leu Asn Pro Glu Val Pro Asp Gln
610 615 620

Phe Tyr Arg Ile Trp Leu Ser Leu Phe Leu His Ala Gly Ile Val His
625 630 635 640

Cys Leu Val Ser Val Val Phe Gln Met Thr Ile Leu Arg Asp Leu Glu
645 650 655

Lys Leu Ala Gly Trp His Arg Ile Ser Ile Ile Phe Ile Leu Ser Gly
660 665 670

Ile Thr Gly Asn Leu Ala Ser Ala Ile Phe Leu Pro Tyr Arg Ala Glu
675 680 685

Val Gly Pro Ala Gly Ser Gln Phe Gly Leu Leu Ala Cys Leu Phe Val
690 695 700

Glu Leu Phe Gln Ser Trp Gln Leu Leu Glu Arg Pro Trp Lys Ala Phe
705 710 715 720

Phe Asn Leu Ser Ala Ile Val Leu Phe Leu Phe Ile Cys Gly Leu Leu
725 730 735

Pro Trp Ile Asp Asn Ile Ala His Ile Phe Gly Phe Leu Ser Gly Met
740 745 750

Leu Leu Ala Phe Ala Phe Leu Pro Tyr Ile Thr Phe Gly Thr Ser Asp
755 760 765

Lys Tyr Arg Lys Arg Ala Leu Ile Leu Val Ser Leu Leu Val Phe Ala
770 775 780

Gly Leu Phe Ala Ser Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ile Tyr Pro Ile Asn
785 790 795 800

Trp Pro Trp Ile Glu Tyr Leu Thr Cys Phe Pro Phe Thr Ser Arg Phe
805 810 815

Cys Glu Lys Tyr Glu Leu Asp Gln Val Leu His
820 825

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 引物

<400> 3
gcaggctagc gtgttaaagg

20

<210> 4
<211> 19

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 引物

<400> 4
aaaacggggt catagcagc 19

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 引物

<400> 5
gcacatctga gggaaggaag 20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 引物

<400> 6
cttccggtca aatgcaaagt 20

<210> 7
<211> 600
<212> DNA
<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 7
agcctacctg aagagigtca gcctacagga gccccgggga cgatggcagg agggcgcaga 60
gaagcgcccc ggcttccgcc gccaggcctc cctgtcccag agcatccgca agagcacagc 120
ccagtgggtt ggggtcagcg gcgactggga gggcaagcga caaaactggc atcgtcgcag 180
cctgcaccac tgcagcgtgc actatggccg cctcaaggcc tcgtgccaga gagaactgga 240
gctgcccagc caggaggtgc catccttcca gggcactgag tctccaaaac cgtgcaagat 300
gcccaagatt gtggatccac tggctcgggg tagggccttc cgccatccag atgaggtgga 360
ccggcctcac gctgcccacc cacctctgac tccaggggtc ctgtctctca catccttcac 420

20

catgtccgct ctggctactc ccatctgccc cgccgcaaga ggatatctgt tgcccatatg 480
agcttttcagg cagccgccgc cctcctcaag gggcggttccg tgctagatgc gactgggcag 540
cgggtgccggc atgtcaaacg cagcttcgct taccccagct tcctggagga ggatgctgtc 600

<210> 8
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 引物

<400> 8
actctgctct cagccgctt 19

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 引物

<400> 9
ccagacacat gctggagcta 20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 引物

<400> 10
gcacatctga gggaaggaag 20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 引物

<400> 11
cttccggtca aatgcaaagt 20

<210> 12
<211> 600
<212> DNA
<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 12
gtgtcagcct acaggagccc cggggacgat ggcaggaggg cgcagagaag cgccccggct 60
tccgccgcca ggctccctg tcccagagca tccgcaagag cacagcccag tggtttgssg 120
tcagcggcga ctgggagggc aagcgacaaa actggcatcg tcgcagcctg caccactgca 180
gcgtgcacta tggccgcctc aaggcctcgt gccagagaga actggagctg cccagccagg 240
aggtgccatc cttccagggc actgagtctc caaaaccgtg caagatgccc aagattgtgg 300
atccactggc tcggggtagg gccttccgcc atccagatga ggtggaccgg cctcacgctg 360
cccaccacc tctgactcca ggggtcctgt ctctcacatc cttcaccatg tccgctctgg 420
ctactcccat ctgccccgcc gcaagaggat atctgttgcc catatgagct ttcaggcagc 480
cgccgccctc ctcaaggggc gttccgtgct agatgcgact gggcagcggg gccggcatgt 540
caaacgcagc ttcgcttacc ccagcttcct ggaggaggat gctgtcgatg gagctgacac 600

<210> 13
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 引物

<400> 13
cggatccatg gcctcagctg acaagaatgg cagcaacctc cca 43

<210> 14
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 引物

<400> 14
ataaagcttg ctcgatctgg tccacgatgt gatt 34

说明书附图

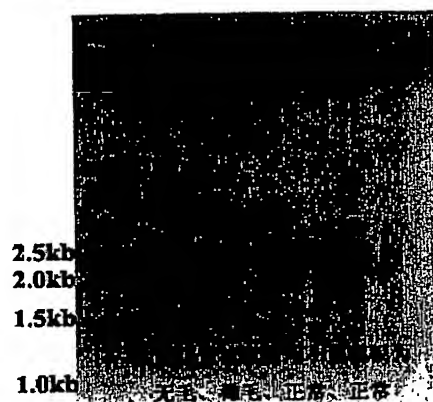


图 1